

令和 6 年 6 月 7 日現在

機関番号：63801

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K15199

研究課題名（和文）神経細胞のin vivo長期動態追跡による大脳皮質モジュール構築機構の解明

研究課題名（英文）Visualization of cortical module formation by longitudinal in vivo neuron tracking

研究代表者

中川 直樹（Nakagawa, Naoki）

国立遺伝学研究所・遺伝形質研究系・助教

研究者番号：30835426

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：大脳皮質感覚野の第4層にはモジュール（単位回路）の並列構造が存在し、感覚情報の高解像度での識別を可能にする。本研究では、マウス体性感覚野においてヒゲ触覚情報処理を担う「バレル」モジュールをモデルとして、生後発達期のモジュール構築に寄与する細胞の動きを可視化するためのin vivoイメージング手法およびデータ解析法の開発を行った。長期in vivoイメージングを用いて、単一神経細胞の動態を生体脳内で3日間にわたり追跡することに成功し、得たデータをもとにモジュール構築過程の細胞動態の解析を進めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

大脳皮質感覚野における機能的モジュールは、感覚情報の混線を防ぎ、高解像度な情報識別を可能にする。したがって、モジュールの構築機序を解明することにより、新生児期の神経活動依存的な脳機能発達、およびその破綻が引き起こす感覚失調の、神経回路レベルでの理解進展が望める。本研究で開発した神経細胞動態追跡のための生体イメージング技術およびデータ解析法は、生後発達期の大脳皮質内で個々の神経細胞が個別のモジュールに適切に組み込まれていく仕組みの解明に貢献することが期待される。

研究成果の概要（英文）：Layer 4 neurons in the mammalian sensory neocortex form functional modules, which enable high-resolution sensory information processing. To understand the cellular dynamics underlying the module formation during postnatal development, we aimed to establish an in vivo imaging system for tracking single neuron behaviors, using the barrel module in the mouse somatosensory cortex as a model. We have developed a long-term in vivo imaging system to track the movement of single layer 4 neurons during module migration in the neonatal mouse brain, as well as an image analysis pipeline to distinguish the migration of individual neurons from developmental cortical expansion.

研究分野：神経科学

キーワード：大脳皮質 神経回路形成 in vivoイメージング バレル皮質 単一細胞動態追跡

1. 研究開始当初の背景

視覚や聴覚、体性感覚などの感覚情報処理を担う大脳皮質感覚野の第4層 (layer4, L4) にはモジュール (単位回路) の並列構造が存在し、多様な感覚情報の高解像度での識別に重要な役割を担っている。大脳皮質 L4 モジュールの実体は、末梢感覚器にて受容された感覚情報を大脳皮質へと中継する視床皮質軸索と、その神経入力を受ける大脳皮質 L4 の興奮性神経細胞によって構成される神経回路であり、生後の発達期に構築される。モジュール単位での刺激応答性の違いによって、感覚情報の特性を高解像度で識別することが可能となる (周波数地図、体部位再現など)。こうしたモジュール機能の異常は発達障害に伴う感覚失調の要因となる可能性が示唆されている。したがって、生後発達期のモジュール構築機構を理解することは、脳機能発達プロセスおよびその破綻による病態発症機序の両側面の理解において重要な課題である。

大脳皮質 L4 のモジュール特異的な回路配線は、動物の出生直後には見られず、生後発達期に末梢から視床皮質軸索を経由して伝わる神経入力の影響を受けて構築されることが知られていた。しかしながら、精確な並列回路の構築において重要なプロセスである、「個々の L4 神経細胞が発達過程で所属すべきモジュールを決定する仕組み」は依然として不明であった。

2. 研究の目的

本研究では、生体イメージングを用いて、生後発達期のモジュール構築期間中の単一神経細胞の動態を追跡することによって、個々の神経細胞が所属モジュールを決定する仕組みを“細胞の動き”から解読することを目的とした。そのために、マウス体性感覚野のヒゲ感覚処理領域に存在する「バレル」モジュールをモデルとして用いた。バレルモジュールは、L4 神経細胞がモジュールごとに機能的・組織学的クラスターを形成するという特長を有する。個々のヒゲに対応する大脳皮質の各バレルでは、L4 神経細胞が、所属のバレルに投射する視床皮質軸索終末を取り囲むように分布することによって、対応する 1 本のヒゲ由来の触覚刺激を選択的に受容することを可能にしている。L4 神経細胞のこのモジュール特異的な空間分布は出生直後にはみられず、生後第 1 週に、視床からの入力依存的に構築される。したがって、この L4 神経細胞の分布再編は、個々の神経細胞の所属モジュールの決定過程を反映していると考えられる。そこで本研究では、L4 神経細胞が出生直後の一様な分布から個別のバレル型分布へと再編成されるプロセスにおける細胞動態の解明を目指した。

具体的には、生きたマウスの大脳皮質内でバレル形成過程の L4 神経細胞の動きを追跡するための *in vivo* イメージング手法を確立すること、および、得られるデータをもとに L4 神経細胞の移動パターンを明らかにするための定量解析手法を開発すること、を目指した。さらに、局所的な細胞死がバレル型細胞分布の形成に寄与する可能性も考えられたため、上記の *in vivo* イメージングデータから L4 神経細胞の細胞死を解析する手法についても検討することとした。

3. 研究の方法

(1) バレル皮質 L4 神経細胞の標識

大脳皮質における個々のバレルモジュール (視床皮質軸索終末のクラスター) を可視化するため、視床皮質軸索 (Thalamocortical axon, TCA) に緑色蛍光タンパク質 (GFP) を発現する TCA-GFP トランスジェニックマウス (Mizuno et al. Neuron 2014) を用いた。胎生 14 日目 (E14) での子宮内電気穿孔 (IUE) によって、TCA-GFP マウスの L4 神経細胞に対して核局在型赤色蛍光タンパク質 (nl-s-RFP) を発現させ、L4 神経細胞の核を RFP 標識した。

(2) 組織学的解析

4%パラホルムアルデヒドを用いてマウスを灌流固定した後に脳を摘出した。冠状断あるいは接線方向の大脳皮質切片を作製し、共焦点顕微鏡で観察した。

(3) タイムラプス生体イメージング

生後 3 日齢 (P3) のマウス頭部に、観察窓と頭部固定用のチタンバーを取り付けた。麻酔下のマウスを顕微鏡ステージに固定し、二光子励起顕微鏡を用いて L4 神経細胞 (RFP) とバレル (TCA-GFP) を可視化し、L4 を含む Z スタック画像を取得した。バレル形成時期である P3-P6 にかけて、同一個体について 24 時間間隔でイメージングを行った。イメージング中はヒーターで仔マウスの体温を保持し、イメージング後は仔マウスを母親マウスの元に戻して養育させた。

4. 研究成果

(1) タイムラプス生体イメージング

マウス大脳皮質体性感覚野 L4 では、L4 神経細胞のバレル型分布は生後の第一週に (P3-P6 にかけて) 徐々に形成される。バレル領域における L4 神経細胞の細胞動態を追跡するため、上記の方法で視床皮質軸索と L4 神経細胞をそれぞれ GFP と RFP で標識したマウスを用いて、P3-P6 にかけて 24 時間間隔で、二光子励起顕微鏡を用いたタイムラプス生体イメージングを行った。TCA-GFP の蛍光強度、および脳表面からの深さ情報をもとに、イメージングの対象であるバレル領域の L4 を特定した。細胞動態の追跡で重要になるのは、P3、P4、P5、P6 の各タイムポイントで完全に同一の視野を繰り返し撮像することである。本研究では、L4 神経細胞の標識密度を最適化することで、L4 の細胞分布パターンから同一視野を特定し、同一の nls-RFP 標識 L4 神経細胞を特定することに成功した。同一視野の特定には、脳表面の血管網パターンも補助的に使用した。バレル領域における L4 神経細胞の 3 次元分布を解析するために、各タイムポイントにおいて脳表面から L4 までを Z 軸方向に連続して撮像した。

以上より、L4 神経細胞の動態追跡のための生体イメージング実験系を確立することができた。本手法により、一視野あたり 5-6 個のバレルを観察することが可能となり、同一個体の複数のバレルモジュールについて、L4 神経細胞の空間位置データを取得することが可能となった。

(2) 細胞移動パターンの解析

細胞移動パターンの解析における大きな課題の一つは、成長に伴い脳が急激に拡大する新生仔期において、大脳皮質の拡大による受動的な細胞位置変化の影響を補正し、バレル形成に寄与する細胞移動成分のみを抽出することである。マウス体性感覚野において、L4 の神経細胞がバレル型分布 (視床皮質軸索クラスターを取り囲む樽状の分布) を形成するのに対して、より表層の第 2、3 層 (L2/3) 神経細胞は、バレル型分布を形成しないことが知られている。そこで本研究では、L2/3 神経細胞は接線方向には移動しない (あるいは L4 神経細胞の接線方向移動よりも有意に小さい) と仮定して、L2/3 神経細胞の位置をもとに大脳皮質の拡大による細胞位置変化の補正を行うこととした。本研究で使用した細胞標識方法 (E14 での IUE) では、L4 神経細胞が主に標識されるが、わずかながら L2/3 神経細胞も標識される。したがって、上記のイメージング実験では、P3、P4、P5、P6 の各タイムポイントでの L2/3 神経細胞の位置データも取得される (L2/3 と L4 神経細胞の区別は、脳表面からの深さおよび TCA-GFP の蛍光強度をもとに行った)。今回、L2/3 神経細胞の P3-P6 にかけての位置変化をもとにして大脳皮質の拡大率を算出した。この拡大率を使用して L4 神経細胞の分布を補正することで、脳拡大による受動的な位置変化を除外したバレル形成に寄与する移動成分を抽出し、細胞動態解析に使用する数値として算出した。以上より、「L4 細胞が所属バレルを決定する動き」の解析基盤を整えることができた。今後は、移動の開始時期や方向・距離などの移動パラメータを算出し、個々の L4 神経細胞が特定のカラムを選択する際の移動パターンを明らかにする。

(3) 細胞死の解析

バレルモジュールの細胞分布として、バレル (視床皮質軸索終末のクラスター) の外周部 (wall) は L4 神経細胞の密度が高く、中心部 (hollow) およびバレル間の間隙部 (septa) は細胞密度が低いことが知られている。このバレル構造の形成メカニズムとして、L4 神経細胞の wall 領域に向かう移動、あるいは領域特異的な細胞死 (septa と hollow の L4 神経細胞が選択的に除去される)、の二つの可能性が考えられているが、過去にそれらの細胞動態を生体脳内で実際に観察した報告はない。そこで、同一の L4 神経細胞をバレル形成期間の P3-P6 にかけて追跡できる上記の生体イメージングを利用して、L4 神経細胞の細胞死の動態を解析することとした。

具体的には、イメージング期間中に細胞が観察されなくなる (nls-RFP 蛍光が消失する) ケースを L4 神経細胞の細胞死と解釈し、その発生時期・頻度およびバレルとの位置関係 (細胞死直前の L4 神経細胞が wall、hollow、septa のどこに分布するか) を解析した。本解析と上記 (2) の移動パターン解析によって、細胞移動と細胞死の両側面から L4 神経細胞動態の解析を行うことで、所属バレル決定に寄与する細胞動態が明らかとなることが期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Nakagawa Naoki, Iwasato Takuji	4. 巻 42
2. 論文標題 Golgi polarity shift instructs dendritic refinement in the neonatal cortex by mediating NMDA receptor signaling	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 112843 ~ 112843
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.celrep.2023.112843	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 2件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Naoki Nakagawa
2. 発表標題 Golgi polarity shift instructs thalamocortical module formation in the neonatal barrel cortex
3. 学会等名 第38回熊本医学・生物科学国際シンポジウム「機能的脳神経回路システムの構築メカニズム」（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Naoki Nakagawa, Shingo Nakazawa, Takuji Iwasato
2. 発表標題 Direct visualization of cortical column formation by longitudinal in vivo neuron tracking
3. 学会等名 第46回日本神経科学大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Naoki Nakagawa, Takuji Iwasato
2. 発表標題 Activity-regulated positioning of the Golgi apparatus facilitates dendritic refinement in the developing mouse barrel cortex
3. 学会等名 第45回 日本神経科学大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Naoki Nakagawa, Takuji Iwasato
2. 発表標題 Golgi apparatus polarity shift facilitates dendritic refinement in the neonatal barrel cortex
3. 学会等名 Development and Plasticity of the Brain (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Naoki Nakagawa, Takuji Iwasato
2. 発表標題 Golgi apparatus polarization facilitates dendritic refinement in the developing neocortex
3. 学会等名 Neuroscience 2022 (Society for Neuroscience) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Naoki Nakagawa, Takuji Iwasato
2. 発表標題 Developmental dynamics of the Golgi apparatus regulate dendritic refinement in the mouse barrel cortex
3. 学会等名 第44回 日本神経科学大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Naoki Nakagawa
2. 発表標題 Activity-regulated positioning of the Golgi apparatus facilitates dendritic refinement in the neonatal mouse barrel cortex
3. 学会等名 Symposium "Circuit Construction in the Mammalian Brain"
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------